

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“EVALUACIÓN DEL MÉTODO DIRECTO PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA DE
ENTEROBACTERIAS EN UROCULTIVO DE
PACIENTES CON BACTERIURIA SIGNIFICATIVA
ATENDIDOS EN EL HOSPITAL DOCENTE MADRE
NIÑO SAN BARTOLOMÉ 2013-2014”**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área
de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica**

AUTOR

Zaida Patricia Sahuanay Blácido

ASESOR

Elizabeth Pareja Cuadros

Lima – Perú

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA



Evaluación del método directo para la identificación y antibiograma de Enterobacterias en Urocultivo de pacientes con bacteriuria significativa atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé 2013-2014

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTORA

Zaida Patricia, Sahuanay Blácido

ASESORA

Lic. TM. Elizabeth Pareja Cuadros

CO-ASESOR

Lic. TM. Javier Soto Pastrana

Lima – Perú

2015

Dedicado:

A Dios por guiar mis pasos e iluminarme en el camino hacia mis metas.

A mis padres Herbert y Patricia, cuyo ejemplo y esfuerzo siempre será una inspiración para mí.

Y a mis hermanos por su apoyo incondicional y motivación para salir siempre adelante.



AGRADECIMIENTOS:

- A mis asesores. Lic. TM Elizabeth Pareja Cuadros y Lic.TM Javier Soto Pastrana, por su apoyo incondicional en la realización y culminación de esta tesis y por ser mi inspiración en el mundo de la Microbiología.
- Al Dr. Cesar Gutiérrez Villafuerte, por su asesoría y orientación que ha hecho posible la culminación de esta investigación.
- Al personal de Laboratorio de Microbiología del Hospital San Bartolomé, por permitirme formar parte de su equipo durante la ejecución de esta investigación, por sus enseñanzas y sabios consejos.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	4
2.1 INTRODUCCIÓN	4
2.2 OBJETIVOS	13
III. MÉTODO	14
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	14
3.2 DISEÑO	14
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	14
3.4 VARIABLES	15
3.5 MATERIALES Y MÉTODO	15
3.6 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS	19
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
6.1 CONCLUSIONES	33
6.2 RECOMENDACIONES	33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
VIII. ANEXOS	40

I. RESUMEN

Objetivo: Evaluar el método directo en la identificación y antibiograma de Enterobacterias en pacientes con bacteriuria significativa atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé.

Materiales y Método: Estudio descriptivo de corte transversal. Se procesó 173 muestras de orina con sospecha de bacteriuria significativa, inoculándose directamente la muestra en medios diferenciales y en dos placas de agar Mueller Hinton al que se le colocó 10 antibióticos; paralelamente, se procesó las muestras según el protocolo estandarizados para urocultivo, identificando el uropatógeno por las reacciones presentadas en la serie bioquímica y categorizando los halos de inhibición antibiótica según los puntos de corte vigentes señalada por la CLSI. Finalmente se comparó los resultados por ambos métodos y se calculó el nivel de concordancia mediante el índice Kappa.

Resultados: 154 muestras fueron analizadas y comparadas por ambos métodos, hallándose un índice Kappa de 0.89, siendo considerada una concordancia “Casi perfecta”. En el caso del antibiograma, muestras fueron evaluadas obteniéndose un índice Kappa para el antibiótico Trimetoprim-Sulfametoxazol de 0.97, Ciprofloxacina, 0.82, Gentamicina, 0.94, Ampicilina, 0.92 y Ceftriaxona, 0.93 categorizados como una correlación “Casi perfecta”; en el caso de la Cefalotina presentó un índice de 0.64 y Amoxicilina – Ac. Clavulánico de 0.74 que se valoran como una concordancia “Considerable”, para la Nitrofurantoína, se halló un índice de correlación de 0.56 considerada como una concordancia “Moderada” y para la Amikacina, se obtuvo un índice de 0.28 categorizada como “Aceptable”.

Conclusión: El método directo es un protocolo alternativo válido y confiable, que permite reportar en menos tiempo el agente infeccioso y el patrón de susceptibilidad con el cual puede iniciarse una terapia antibiótica adecuada, sin embargo es imprescindible valorar el resultado según la pureza y recuento de colonias, así como también confirmarlo con la identificación y antibiograma convencional.

Palabras clave: Método directo, método estandarizado, índice kappa, urocultivo

ABSTRACT

Objective: Assess the direct method in the identification and susceptibility of Enterobacteriaceae in patients with significant bacteriuria treated at Hospital Madre Niño San Bartolomé.

Materials and Methods: Descriptive cross-sectional study. 173 urine samples with suspected significant bacteriuria were directly processed, by inoculating the sample in differential media and two Mueller-Hinton agar plates to which was placed 10 antibiotic disks in parallel, the samples were processed according to the standardized protocol for urine culture, identifying the uropathogen through the reactions outlined in bacterial biochemistry and categorizing series of antibiotic inhibition halos breakpoints as indicated by the CLSI. Finally the results are compared for both methods and the level of agreement was calculated using the Kappa index.

Results: 154 samples were analyzed and compared by the two methods for the identification, obtaining a Kappa index of 0.89, being considered as an "Almost perfect" agreement. In the case of the susceptibility test, 149 samples were compared by the two methods, obtaining a Kappa index of 0.97 for the antibiotic Trimethoprim-sulfamethoxazole, 0.82 for Ciprofloxacin, 0.94 for Gentamicin, 0.92 for Ampicillin and 0.93 for Ceftriaxone, being considered as an "Almost perfect" correlation; Cephalothin present a Kappa index of 0.64 and Amoxicillin - clavulanate 0.74 being considered as a "Substantial" agreement, as well as Nitrofurantoin Kappa index of 0.56 was considered to have as a "Moderate" agreement. On the other hand, Amikacin had a "Fair" agreement (Kappa index of 0.28).

Conclusion: The direct method is a valid and reliable alternative protocol, which allows to identify the bacterial infectious agent and find the pattern of antibiotic susceptibility in less time, which can be initiated with appropriate therapy. However, it is essential to evaluate the results according to the purity and counting colonies, as well as identify and confirm the results with conventional susceptibility.

Keywords: direct method, standardized method, kappa coefficient, urine.

II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

2.1 INTRODUCCIÓN

Entre las infecciones más frecuentes que afecta al ser humano, la infección del tracto urinario constituye un importante problema de salud, que origina una amplia variedad de formas clínicas y son el motivo de miles de consultas cada año (1 - 5).

La infección de tracto urinario se define como la colonización, invasión y multiplicación activa de un microorganismo en las vías urinarias (6). Estas infecciones por lo general tienen un origen bacteriano, siendo la *Escherichia coli* el agente etiológico responsable del 75 a 85% de los casos y en menor proporción, otras enterobacterias y cocos Gram positivos (1, 3, 6 – 10).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que las infecciones del tracto urinario afectan en mayor medida a las mujeres, si bien es cierto dentro de los primeros 3 meses de vida la infección es más frecuente en los niños, por encima de esta edad las mujeres se encuentran más expuestas a esta infección (5, 10). A partir de los 50 años la prevalencia tiende a igualarse en ambos sexos, debido a las modificaciones anatómicas y fisiológicas naturales del cuerpo (1, 3, 6, 11).

El urocultivo es la prueba de laboratorio estándar para el diagnóstico de la infección del tracto urinario, ya que nos permite demostrar la existencia de bacteriuria significativa. Sin embargo, la prueba está condicionada a una interpretación según la técnica de la toma de muestra y el número de unidades formadoras de colonias desarrolladas en el cultivo (1, 2, 6, 9, 11 – 13).

La orina es un fluido corporal estéril que, durante su recolección, suele contaminarse fácilmente por la microbiota del perineo, uretra o vagina. Por lo tanto, debe tomarse en consideración ciertas medidas para la óptima recolección de la muestra (4,10). En este sentido, se recomienda obtener la primera orina de la mañana debido a su mayor concentración bacteriana, aunque no es indispensable (12), con abstenerse de orinar durante 3 a 4 horas se disminuiría la probabilidad de un resultado falso negativo (4, 14).

Entre los diferentes métodos para la obtención de la muestra de orina, la micción media o chorro medio es la muestra que con mayor frecuencia se procesa en los urocultivos. Aunque ésta sea de fácil obtención, exige de una recogida cuidadosa, recomendándose el lavado de los genitales antes de la toma de muestra, y durante la recolección evitar que la muestra orina entre en contacto con los genitales externos (12, 14). En casos de difícil obtención de la muestra, debido a limitaciones físicas, clínicas o mentales, los métodos invasivos como el cateterismo y punción supra-púbica son métodos recomendados; estas muestras al ser directamente recolectados de la vejiga reduce en gran medida la contaminación y cualquier hallazgo microbiológico debe ser considerado significativo (12).

El tiempo empleado en el transporte de la muestra hacia el laboratorio no debe de superar las 2 horas a temperatura ambiente. En caso de no realizarse el procedimiento inmediatamente, es recomendable conservar la muestra a 4°C para evitar el sobre crecimiento bacteriano (4,10 -12, 14).

La técnica de cultivo semi-cuantitativo con el asa calibrada, es el método más difundido para la realización del urocultivo y consisten en inocular un volumen determinado de orina sobre el medio de cultivo y estriarlo homogéneamente sobre la superficie. Generalmente se utiliza asas de 0,01 y 0,001 ml que nos permite cuantificar recuentos de 100 a 1000 UFC/ml y más de 100 000 UFC/ml. (10, 14). Para ello se recomienda utilizar dos tipos de medio de cultivo: uno no selectivo como el agar sangre el cual favorece el desarrollo de la mayor parte de uropatógenos y además nos permite realizar el recuento de unidades formadoras de colonia y un medio selectivo como el agar MacConkey que permite el desarrollo y diferenciación de las enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores. Muchos laboratorios, además emplean otros medios de cultivo como el agar CLED y cromogénico que facilitan la identificación directa del microorganismo en el medio, ventajas que se debe evaluar al igual que el costo (10, 12,14). La incubación se realiza de 18 a 24 horas a 35 - 37°C a atmósfera aeróbica; en caso de cultivos de crecimiento insuficiente o que se sospecha de una bacteriuria y presenta un cultivo negativo se puede extender la incubación por 48 horas (4, 10, 14).

Si bien es cierto, el cultivo de orina es la prueba estándar para el diagnóstico de infección del tracto urinario, se ha desarrollado diferentes técnicas para la detección de bacteriuria y piuria que nos proporciona un diagnóstico presuntivo de la infección (2, 4, 13, 14). Entre los métodos descritos para la detección de bacteriuria, se incluye la determinación de leucocitos, nitritos y la coloración de Gram, esta última más empleada debido a la rapidez, simpleza y bajo costo; estos métodos ha sido ampliamente evaluados y presentan una buena correlación cuando el recuento en el cultivo es igual o mayor a 10^5 UFC/ml (1, 2, 4, 14).

En la coloración Gram de muestras de orinas no centrifugadas, la presencia de un microorganismo por campo de 100x en 10 ul de muestra corresponde aproximadamente a 100 000 UFC/ml en el cultivo (1, 2, 4, 12 - 14). Numerosos estudios describen sensibilidades de 74% a 98% y especificidades de 73% a 98% (2, 6, 15 – 17).

El nitrito es producto de la degradación de los nitratos por el metabolismo bacteriano, y la mayoría de los organismos más comunes causante de las infecciones urinarias, como los bacilos Gram negativos, son nitrato-reductores; por lo tanto, la presencia de nitritos indica indirectamente bacteriuria. Algunos microorganismos, como *Enterococos*, *Estafilococos* y levaduras no reducen los nitratos pudiendo dar falsos negativos en el diagnóstico (18). La prueba más común para la detección de nitritos es el ensayo de Griess, siendo muy específica pero poco sensible, por lo que un resultado positivo es útil, pero un resultado negativo no descarta una infección del tracto urinario (19). Además de los microorganismos no reductores de nitrato, la elevada concentración de ácido ascórbico y/o urobilinógeno, la dilución o la inadecuada retención de la orina en la vejiga pueden dar falsos negativos, en cuanto que los medicamentos pueden colorear la muestra, interfiriendo en el ensayo, generando falsos positivos (18, 19).

El análisis de nitrito por el método de Griess es altamente específico de una infección urinaria, pero presenta una baja sensibilidad que varía entre 53% a 92% (4, 6, 18).

La presencia de leucocitos en la orina es evidencia de una respuesta inmunológica frente al agente causal de la infección. Los métodos para la detección de leucocitos son diversas, entre las que se incluyen la microscopía de la muestra no centrifugada con una sensibilidad de 90% y especificidad de 93.6% (20); otro método es la detección de la esterasa leucocitaria, cuya sensibilidad puede alcanzar el 66% y una especificidad de 74% para sospecha de infecciones urinarias (15).

La interpretación de los cultivos, se fundamenta en el recuento de colonias, el tipo y número de microorganismos desarrollados en el cultivo, la forma de recolección de la muestra, el resultado de las pruebas auxiliares y los datos clínicos del paciente (14). El criterio clásico descrito por Kass donde se considera recuentos iguales o mayores a 10^5 UFC/ml como indicativo de bacteriuria significativa, no puede ser aplicado como criterio general para todas las muestras ya que recuentos menores, bajo ciertas circunstancias admiten la existencia de una infección del tracto urinario (10, 12).

En muestras obtenidas por punción supra-púbica o que proceden directamente del riñón, cualquier recuento es indicativo de infección. Así mismo en orinas recolectadas por sonda vesical un recuento de 10^2 a 10^5 UFC/ml es considerado significativo (4, 10, 12, 14). En varones menores de 65 años, cuya muestra es menos susceptible a contaminarse, un recuento $\geq 10^3$ UFC/ml debe considerarse, de igual modo en mujeres con síntomas urinarios sugestivos debe valorarse recuentos $\geq 10^2$ UFC/ml (10, 12).

La identificación tradicional de las bacterias implicadas se realiza en base a las características morfológicas, a sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y nutricionales propias del microorganismo (20). Las pruebas bioquímicas se fundamentan en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas del material genético de la bacteria, que pueden evidenciarse a través de los medios especiales utilizados para su identificación *in vitro* (21, 22). Con los resultados de las pruebas bioquímicas, la identificación final se efectúa mediante sistemas de diagramas o flujos ramificados (22). Actualmente los sistemas automatizados identifican mediante programas informáticos en base a códigos y probabilidades (21-23).

Una vez aislado e identificado el microorganismo patógeno, es necesario determinar su comportamiento frente a los agentes antimicrobianos apropiados dependiendo de la infección que se trate, para iniciar una terapia antibiótica adecuada. El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI), define el antibiograma como un perfil general de los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de una especie microbiana frente a un grupo de agentes antimicrobianos (24).

Se crearon varios tipos de pruebas para la susceptibilidad (o sensibilidad) a antibióticos. Las dos pruebas de referencia son los procedimientos de dilución en caldo o en agar. Ambos están diseñados para encontrar la mínima concentración de un antibiótico que inhibe el desarrollo visible del microbio *in vitro*. La prueba utilizada con mayor frecuencia para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos es el método de difusión con discos de Kirby – Bauer, en el cual las interpretaciones clínicas se deducen por correlación con la prueba de referencia (22).

El antibiograma por disco difusión, basado en el trabajo de Kirby, Bauer et al., es un método cualitativo estandarizado por el CLSI que presenta las ventajas de una gran flexibilidad en la elección de los antibióticos, bajo costo y fácil realización (10, 12, 25). El método de disco difusión consiste en depositar sobre un medio de Mueller Hinton, previamente inoculado con el microorganismo a estudiar, discos de papel impregnados con diferentes antibióticos a concentraciones fijas. Cuando el disco toma contacto con la superficie húmeda del medio, absorbe agua y permite que el antibiótico se difunda por el agar, logrando así un gradiente de concentración alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo estará determinada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (25-28).

Para que los diámetros de los halos de susceptibilidad sean comparables con las tablas que presenta el CLSI, el procedimiento debe seguir el método estandarizado (29), controlando los componentes y factores que intervienen en la técnica tales como:

1. El medio de cultivo, el agar Mueller Hinton es considerado el mejor medio de cultivo para la prueba de susceptibilidad de microorganismos no exigentes debido a la reproducibilidad de la prueba de sensibilidad entre los diferentes lotes, la concentración de los inhibidores de la sulfoamida, trimetoprima y tetraciclina es baja, el crecimiento de la mayor parte de patógenos no exigentes es satisfactorio y existe suficiente datos y estudios que avalan la calidad de la prueba de sensibilidad realizadas con este medio.

Aun cuando las características del Mueller Hinton lo hacen confiable para las pruebas de susceptibilidad, existen ciertos parámetros que deben de controlarse, tales como el pH del medio, que debe encontrarse entre 7,2 y 7,4, la cantidad de Timidina o Timina, la concentración de los cationes divalentes, como el calcio y magnesio, que afectan la actividad de ciertos antibióticos y el espesor del agar en la placa, la cual debe encontrarse entre los 3 a 5 mm pues afecta en la difusión del antibiótico en el medio y en consecuencia en la prueba de susceptibilidad del microorganismo (15, 25, 27, 29, 30).

2. La turbidez del inóculo, es la suspensión del microorganismo que debe ser igual al 0.5 de la escala de McFarland, lo cual equivale aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, esto se puede lograr comparando con un patrón de turbidez de BaSO_4 que equivalga a 0.5 McFarland (29, 30).
3. La incubación del antibiograma, salvo ciertas excepciones con algunos microorganismos, deben incubarse a 35°C durante 16 a 18 horas sin concentraciones aumentadas de CO_2 (29).
4. La conservación de los discos conteniendo antibióticos, es sumamente importante para garantizar su actividad y potencia, se sugiere que los discos en uso deben de mantenerse refrigerados de 2 a 8°C , en caso de almacenarse por largos plazos debe congelarse a -14°C (28). La cantidad de discos colocados en la placa depende del tamaño de esta, 12 en una placa de 150 mm y máximo 6 en una placa de 100 mm para evitar la superposición de halos (29).

La selección final del antibiótico debe ser por consulta con las listas de agentes antimicrobianos sugeridas por el Instituto Nacional de Salud (INS), cuya relación de antibióticos que presenta en su relación han sido seleccionada teniendo en cuenta diversos criterios tales como:

- ❖ Eficacia clínica documentada.
- ❖ Representatividad de una familia de antibióticos.
- ❖ Disponibilidad de criterios técnicos fiables para la determinación in vitro de su eficacia clínica.
- ❖ Estabilidad de la molécula en los discos para antibiograma.
- ❖ Presencia en el mercado nacional.
- ❖ Importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana.

El INS ha consensuado y distribuido los antibióticos en dos grupos, un primer grupo donde se encuentran los antibióticos de base indispensables para orientar el tratamiento de las diferentes infecciones, cuya inclusión en el antibiograma y reporte de los mismos es de carácter obligatorio, y un segundo grupo cuya inclusión en el antibiograma y reporte es de carácter opcional, pues depende de los esquemas de antibioterapia vigentes en cada hospital y de la epidemiología local de la resistencia bacteriana (31).

La categoría interpretativa es una clasificación que se establece a partir de la respuesta de un microorganismo frente a un antibiótico, donde se establece “puntos de corte” y nos permite categorizar como “sensible”, cuando el agente aislado es inhibido por las concentraciones que alcanza el antibiótico en una dosis recomendada, “intermedia”, cuando presenta una sensibilidad disminuida, pero que puede utilizarse con éxito para el tratamiento en dosis más alta porque se concentra en el lugar de la infección, también se considera en esta categorías a los antibióticos que frente a la cepa no puede ser utilizado en mayor concentración por ser tóxico, y “resistente” cuando los aislamientos no son inhibidos por las concentraciones de antimicrobiano, cualquiera sea la dosis y la localización de la infección (28, 29).

Los tamaños de las zonas de inhibición debe ser interpretados con la tablas vigentes que presenta el CLSI, ya que son periódicamente publicadas y pueden contener variaciones. Finalmente con el reporte de la identificación y la susceptibilidad de los antibióticos, el clínico es quién toma la decisión de los fármacos y sus dosis.

La terapia empírica se emplea de manera frecuente en la atención primaria basándose en el conocimiento de la etiología probable y de patrones de sensibilidad al antibiótico (1, 8, 24, 25). Sin embargo, la resistencia bacteriana se ha incrementado haciendo que este tipo de terapia fracase (24). Muchos autores aseguran que la resistencia bacteriana se relaciona con el consumo de ésta, ya que la presión selectiva que ejerce, favorece la creación, adaptación y diseminación de los mecanismos de resistencia; entre los factores asociados descritos figuran la edad, la hospitalización y el tratamiento previo o empírico (3, 27, 32).

La sensibilidad antibiótica así como la identificación del uropatógeno estandarizada, se obtiene a las 48 horas de haber recolectado la muestra de orina; tardando de esta manera la terapia recomendada, es por ello que se hace necesario un método económico y factible para obtener el resultado de la identificación y susceptibilidad en el tiempo más corto posible. El método directo de identificación y susceptibilidad antimicrobiana, es un protocolo alternativo que permite identificar y presentar el patrón de susceptibilidad en 24 horas en muestras con bacteriuria significativas, con lo cual se optimizaría el tiempo para el inicio del tratamiento (33-35).

Un estudio realizado en 1976 por Hollick y Washington (34); encontraron una concordancia 95.5% entre el método estandarizado por el CLSI y el método directo en 246 muestras de orina con un recuento puro mayor a 10^5 UFC/ml. Sin embargo se encontró 2 cultivos con discrepancia muy mayor (0.8%), 16 con discrepancia mayor (6.5%) y 53 con discrepancia menor (21.5%); en donde se clasifica como discrepancia muy mayor a los reportes de resistente por el método estandarizado y sensible por el método directo, discrepancia mayor al reporte de sensible por el método estandarizado y resistente por el método

directo y discrepancia menor al reporte de intermedio por un método y resistente o sensible por el otro.

Otro estudio realizado en 1994 por Oakes, et al. (33), encontraron un 94.3% de concordancia entre el método del CLSI y el método directo en 1 106 aislamientos.

Otro estudio realizado en 1995 por de Jhonson, et al. (35) encontraron una concordancia de 95.5% entre método de susceptibilidad estandarizada y el método directo, en 140 aislamientos de muestras de orina de mujeres con sospecha de ITU. Sin embargo, también se obtuvo un 0.8% de errores muy grandes, 0.6% de grandes errores que 3.1% de errores menores.

En nuestro medio, no se ha evaluado el método directo como protocolo de antibiograma rápido que permita reportar un perfil de susceptibilidad presuntivo de un germen en muestras de orina, por lo que se hace útil conocer el nivel concordancia con respecto al método estandarizado, tanto para la identificación como para la susceptibilidad, y de esta manera disminuir el tiempo en el inicio del tratamiento, logrando evitar complicaciones y el uso irracional de antibióticos en el paciente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el método directo en la identificación y antibiograma de Enterobacterias en pacientes con bacteriuria significativa atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la concordancia entre método directo y el urocultivo estandarizado para la identificación de enterobacterias aislados de pacientes con bacteriuria significativa atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé.
- Evaluar la concordancia entre el método directo y el urocultivo estandarizado para la categorización de la susceptibilidad antimicrobiana en enterobacterias aisladas de pacientes con bacteriuria significativa.
- Categorizar los tipos de errores según el nivel de discrepancia en la interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana.

III. MÉTODO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es descriptiva y de corte transversal.

3.2 DISEÑO

Estudio observacional.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población está conformada por las muestras de orina con bacteriuria significativa de pacientes ambulatorios atendidos en el laboratorio de microbiología del Hospital Madre Niño San Bartolomé, durante el periodo comprendido de Diciembre 2013 a Abril 2014.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, considerando a las muestras de orina con bacteriuria significativa.

El tamaño de la muestra (n) fue obtenida mediante la fórmula general, asumiendo una prevalencia de urocultivos positivos al año de 13% ($p=0.13$) que presenta el laboratorio de microbiología; con un nivel de confianza de 95%, que equivale a un $\alpha=0,05$ y un $Z=1,96$.

$$n = \frac{1.96^2 * 0.13 * 0.87}{5^2} = 173$$

Determinándose el tamaño de la muestra de 173 orinas con bacteriuria significativa para la realización del estudio.

3.3.1 Criterios de inclusión

- Muestras de orina de pacientes ambulatorios atendidos en el laboratorio de microbiología del Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé
- Muestras que se recibieron en frascos estériles.
- Muestras de pacientes que presenten nitrito positivo y/o a la coloración Gram más o igual a dos bacterias por campo de 1000X.
- Cultivos puros con un recuento $\geq 10^5$ UFC/ml en el agar sangre.

- Cultivos que a la coloración Gram fueron bacilo Gram negativo.

3.3.2 Criterios de Exclusión

- Muestras de pacientes hospitalizados.
- Muestras con nitrito y Gram negativo.
- Muestras obtenidas en bolsa colectora o frasco no estéril.
- Muestras cuyo cultivo sea mixto o con un recuento menos a 10^5 UFC/ml.
- Cultivos que a la coloración Gram no evidencie ser bacilo Gram negativo.

3.4 VARIABLES

3.4.1 Variable independiente: Identificación y susceptibilidad estandarizada

3.4.2 Variable dependiente: Identificación y susceptibilidad directa.

3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación de la bacteria se emplearon las técnicas descritas en el libro de Microbiología Médica de Koneman (22), y para la susceptibilidad antibiótica se empleó la técnica de disco difusión elaborada por el CLSI (30).

En las instalaciones del laboratorio de Microbiología del Hospital Docente Madre- Niño (HONADOMANI), se realizó los urocultivos siguiendo la secuencia que continuación se describe:

A. Primer día

3.5.1 Procedimiento del cultivo de orina

Las muestras se procesaron según el protocolo descrito en el manual de procedimientos en Microbiología Clínica de la Sociedad Americana de Microbiología y otras bibliografías (14, 36). Cerca de un mechero a gas, se abrió la tapa de frasco de orina y con una asa calibrada estéril de 1µl, se sumergió verticalmente en la muestra, seguido se inoculó en la placa de agar sangre a partir del cual se estrío, a continuación sin quemar el asa se

realiza el mismo procedimiento en la placa de agar MacConkey, luego se llevó las placas a incubar durante 24 horas a 36°C.

3.5.2 Determinación de la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano

Esta prueba se realiza para detectar la presencia de antimicrobiano residual en la muestra de orina (36).

- Se preparó una suspensión 0.5 de Mc Farland de una cepa de *Bacillus subtilis*. Se estrió homogéneamente sobre una placa de agar Mueller Hinton el cual se dividió por la parte posterior en cuadrículas y enumeró según los códigos de la muestras.
- Con ayuda del asa de siembra estéril, se colocó una gota de la muestra de orina, según el número correspondiente. Al final de las siembras del día, se dejó incubar a 36° C por 18 a 24 horas.

3.5.3 Determinación de la muestra con Bacteriuria Significativa

❖ Prueba del Nitrito

La determinación de nitritos en la orina se realizó mediante la reacción de Griess (37). En un placa con pocillos, se colocó 50ul del reactivo A (Ácido sulfanílico al 1%) y 50ul del Reactivo B (Ácido N- Dimetil- α naftilamina al 0,3%). Seguido con un nuevo tip, se agregó 100ul de la muestra de orina. Los pocillos que presentaron una reacción de color purpura se consideraron con presencia de bacterias reductoras de nitrato y con alta probabilidad de bacteriuria significativa.

❖ Coloración Gram

Con un asa de 10 μ l se colocó una gota de orina sobre una lámina portaobjetos (14, 36), se dejó secar y luego se realizó la coloración Gram (22) con cristal violeta por 1 minuto, lugol por 1 minuto, alcohol acetona por 10 segundos y safranina por 1 minuto.

Al término de la coloración, las láminas fueron secadas a temperatura ambiente y luego observadas al microscopio a 1000x.

Se observó un promedio de 20 campos (2, 13), la presencia de dos o más bacterias Gram negativas se consideraron como muestras con bacteriuria significativa (1, 4, 12 - 14).

3.5.4 Antibiograma directo

El un hisopo estéril, se introdujo en el frasco de orina, se escurrió el hisopo en los bordes del mismo frasco y se procedió a inocular sobre la superficie de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo toda la superficie y rotando la placa para asegurar una distribución homogénea del inóculo (33-35).

Las placas de Mueller Hinton sembradas, se dejó secar por un tiempo de 10 minutos y luego se colocó los siguientes antibióticos: Ampicilina, Cefalotina, Ceftriaxona, Amoxicilina – Ácido Clavulánico, Ertapenem, Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Trimetoprim-Sulfametoxazol y Nitrofurantoína.

3.5.5 Identificación directa de las enterobacterias

Con un asa de siembra en punta previamente esterilizada, se sumergió en la muestra de orina y luego se procedió a sembrar, por puntura o estría, dos veces en cada medio diferencial, teniendo en cuenta de sumergir el asa en la orina para inocular cada medio y siguiendo la técnica descrita en el libro de Microbiología Médica de Koneman (22). Los medios diferenciales incluyeron agar Citrato de Simons, agar Triple Azúcar Hierro (TSI), agar Lisina Hierro (LIA), agar Motilidad Ornitina Indol (MIO), para la prueba de indol se colocó un papel embebido con el Reactivo de Kovac en la parte superior del tubo de este medio, agar Úrea de Christensen, Caldo para la prueba de Rojo de metilo y Voges - Proskauer y agar Gelatina Nutriente.

B. Segundo día

3.5.6 Lectura de las placas del urocultivo

Se revisó la placa de agar sangre, se realizó el conteo de colonias y se multiplicó por el factor de dilución (1000) para obtener el número total de UFC por ml (14,36). En caso de ser cultivo puro y con mayor de 100 000 UFC/ml, se procedió a realizar un Gram, si a la coloración fueron Gram negativos se consideró válido el método directo y se procedió a la lectura de la identificación y el antibiograma directo.

3.5.7 Identificación estandarizada

De una colonia aislada del agar sangre, se procedió a picar en cada medio diferencial como lo describe Libro de Koneman (22) tal como se realizó en el método directo.

3.5.8 Antibiograma estandarizado

Se siguió el procedimiento detallado en el manual de CLSI para susceptibilidad antimicrobiana (29).

Se preparó el inóculo suspendiendo una colonia aislada de la placa de agar sangre en solución salina, y luego de ajustó a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland; se sumergió un hisopo en la suspensión bacteriana y se escurrió en las paredes del tubo para luego proceder a inocular en la placa de Mueller Hinton, estriando sobre toda la superficie del agar, rotando la placa y finalmente sobre el borde de este, logrando así una distribución homogénea del inóculo. Se dejó secar durante 10 minutos, luego se colocaron los antibióticos y se dejó incubando a 36°C durante 16 a 18 horas.

C. Tercer día

3.5.9 Lectura de los tubos de identificación estandarizada

Se revisó la reacción de cada medio diferencial y se apuntó las reacciones para finalmente identificar el género y especie de la bacteria haciendo uso de las tablas descritas por Koneman y colaboradores (22).

3.5.10 Medición de halos del antibiograma estandarizado

Con un vernier se midió el diámetro del halo de inhibición producido por cada antibiótico y estos valores fueron interpretados según el manual de CLSI para susceptibilidad antimicrobiana (29).

3.6 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1 Presentación de los Datos

Los datos recolectados fueron almacenados en hojas de Microsoft office Excel 2010, y luego se diseñaron tablas comparativas de la categoría de susceptibilidad antibiótica y la identificación determinada en cada muestra por el método estandarizado y el directo.

Se elaboraron tablas de contingencia para cada antibiótico evaluado y para la identificación de las bacterias. En el caso de la determinación de las susceptibilidades de cada aislamiento, se construyeron tablas de tres por tres, donde se colocaron en filas la frecuencia de las categorías sensible, intermedia y resistente encontradas por el método estandarizado y en columnas la frecuencia de las categorías encontradas por el método directo. Para la identificación bacteriana se elaboraron una tabla de dos por dos, colocando en filas la identificación de *Escherichia coli* y no *Escherichia coli* por el método estandarizado y en las columnas la identificación por el método directo.

3.6.2 Análisis estadístico

Para determinar el grado de concordancia entre el método directo y el estandarizado, se utilizó la prueba de índice Kappa siguiendo la fórmula estadística:

$$K = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Siendo:

$$p_o = \frac{\text{Número de acuerdos}}{\text{Núm. acuerdos} + \text{Núm. desacuerdos}}$$

$$p_e = \sum_{i=1}^n p_{i1} \times p_{i2}$$

Donde:

n= Número de categorías

i= Número de la categoría

p_{i1} = Proporción de ocurrencia de la categoría i por el método estandarizado

p_{i2} = Proporción de ocurrencia de la categoría i por el método directo.

El valor coeficiente Kappa se valoró según la escala de concordancia descrita por Landis y Koch (38).

VALORACIÓN DEL COEFICIENTE KAPPA (Landis y Koch, 1977)

Coeficiente kappa	Fuerza de concordancia
0.00	Pobre (<i>Poor</i>)
0.01-0.20	Leve (<i>Slight</i>)
0.21- 0.40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0.41- 0.60	Moderada (<i>Moderate</i>)
0.61- 0.80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0.81- 1.00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)

IV. RESULTADOS

Se procesaron en total 173 muestras de orina de los cuales 164 (95%) correspondieron al sexo femenino y 9 (5%) al masculino (Tabla 1). El grupo etario fue distribuido en rangos de 10 años obteniéndose que el 54.4% de la población correspondió a grupo de 21-40 años. (Tabla 2)

TABLA 1. Distribución de los pacientes con bacteriuria significativa según el sexo atendido en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé 2013-2014. (n=173)

Sexo	Frecuencia	%
Femenino	164	95
Masculino	9	5

TABLA 2. Distribución de los pacientes con bacteriuria significativa según el grupo etario atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé 2013-2014. (n=173)

Características	Frecuencia	%
Edad		
Menores de 10 años	29	16.8
11-20 años	18	10.4
21-30 años	42	24.3
31-40 años	52	30.1
41-50 años	17	9.8
Mayores de 50 años	15	8.6

De las 173 muestras de orina procesadas con nitrito positivo y/o más de 2 bacilos Gram negativos en campos de 100x, fueron excluidas 19 muestras, por presentar una flora polimicrobiana (12) y por presentar recuentos menor a 100 000 UFC/ml (7), evaluándose 154 muestras que presentaron cultivo con recuento mayor de 100 000 UFC/ml y con un solo patógeno. Entre las características observadas en las muestras de orina procesada por el método

directo, 2 muestras no presentaron desarrollo en los medios diferenciales (Tabla 3), en cuanto que en el antibiograma por el método directo, 149 antibiogramas presentaron un crecimiento homogéneo con halos bien definidos y 5 con doble halo (Tabla 4).

**TABLA 3. Desarrollo en los medios diferenciales por el método directo
(n=154)**

Característica	Frecuencia	%
Desarrollo en medios diferenciales	152	98.7
Sin crecimiento en los medios diferenciales	2	1.3

TABLA 4. Características de los halos de inhibición del antibiograma por el método directo (n=154)

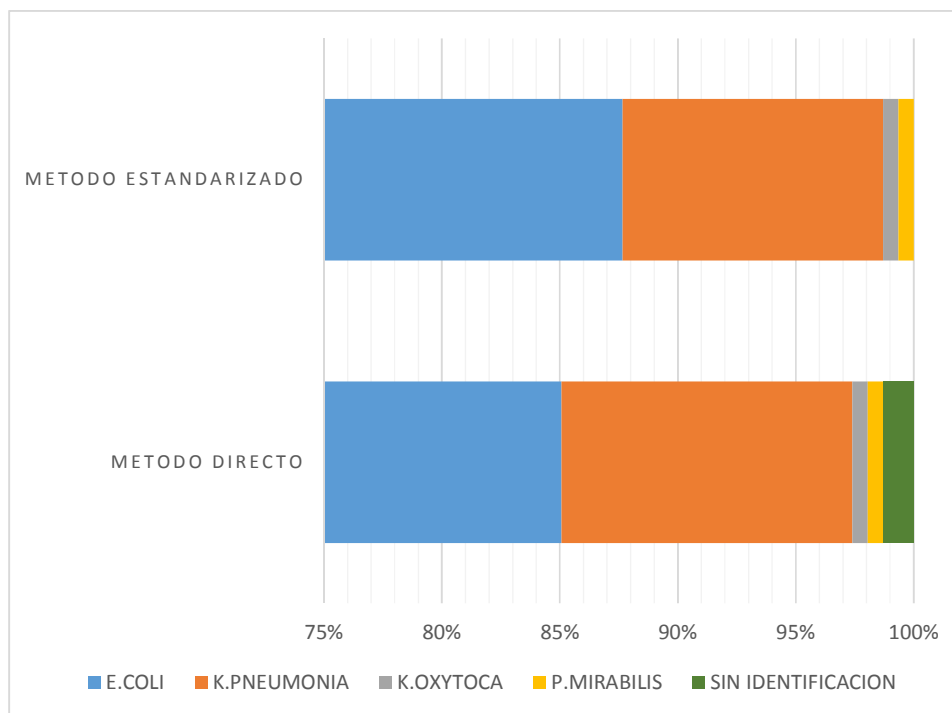
Característica	Frecuencia	%
Halo definido	149	96.8
Doble halo	5	3.2

De los 154 microorganismos identificados por el método estandarizado, 135 (87.7%) fueron *Escherichia coli*, 17 (11.0%) *Klebsiella pneumoniae*, 1 (0.7%) *Klebsiella oxytoca* y 1 (0.7%) *Proteus mirabilis* (Tabla 5). El microorganismo más frecuente identificado por el método directo fue *Escherichia coli* en 131 muestras (85.1%), seguido por *Klebsiella pneumoniae* en 19 muestras (12.3%), *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* se aisló en 1 muestra cada uno (0.6%) y 2 muestras no hubo crecimiento (1.3%) (Gráfico 1)

TABLA 5. Frecuencia en porcentajes de las Enterobacterias identificadas por el método estandarizado y el método directo. (n=154)

Clasificación	Microorganismo Identificado		
	Microorganismo	Método estandarizado	Método directo
		N (%)	N (%)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>	135 (87.7%)	131 (85.1%)
No E.coli	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17 (11.0%)	19 (12.3%)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (0.6%)	1 (0.6%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	1 (0.6%)	1 (0.6%)
	Sin crecimiento	0	2(1.3%)

GRÁFICO 1. Frecuencia en porcentajes de las Enterobacterias identificadas por el método estandarizado y método directo. (n=154)

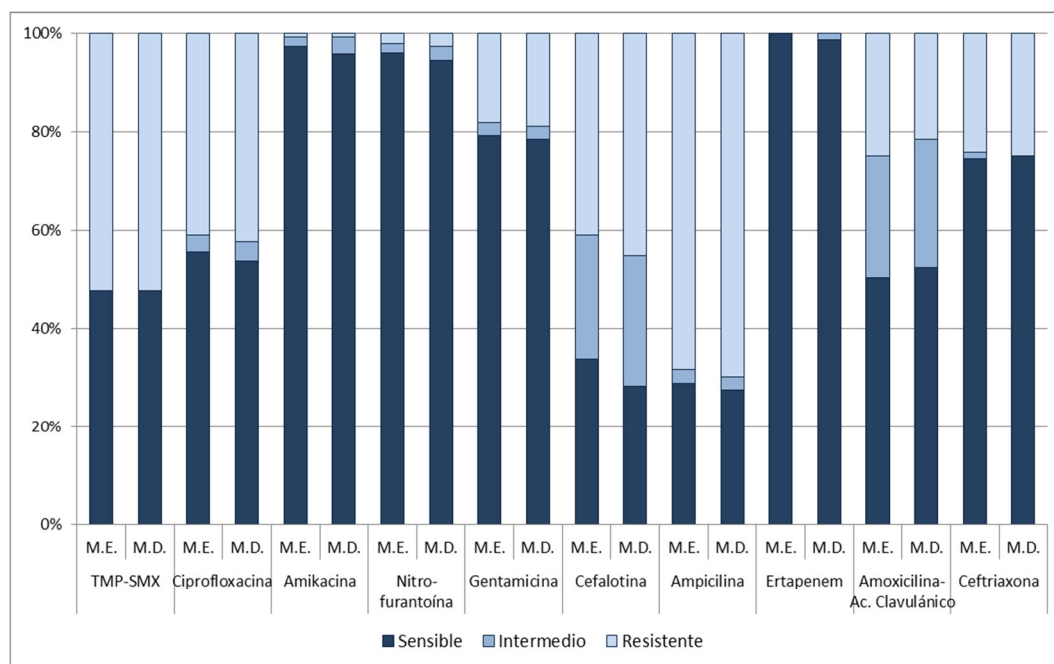


Se evaluaron 10 antibióticos para cada muestra (n=149), y se clasificó según el diámetro de inhibición en sensible, intermedio y resistente. En la tabla 6 se presenta la frecuencia y porcentaje de susceptibilidad del total de gérmenes aislados frente a cada antibiótico estudiado por métodos directo y estandarizado, y en el gráfico 2 se presenta la comparación del perfil de susceptibilidad obtenido por ambos métodos.

TABLA 6. Frecuencia de las categorías susceptibilidad determinadas por el método estandarizado y directo. (n=149)

ANTIBIÓTICO	CATEGORIAS DE SUCEPTIBILIDAD					
	MÉTODO DIRECTO			MÉTODO ESTANDARIZADO		
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Trimetoprim-Sulfametoxazol	71 (47.7%)	0	78 (52.3%)	71 (47.7%)	0	78 (52.3%)
Ciprofloxacina	80 (53.7%)	6 (4.0%)	63 (42.3%)	83 (55.7%)	5 (3.4%)	61 (40.9%)
Amikacina	143 (96.0%)	5 (2.0%)	1 (0.7%)	145 (96.0%)	3 (2.0%)	1 (0.7%)
Nitrofurantoína	140 (94.0%)	4 (2.7%)	5 (3.4%)	143 (96.0%)	3 (2.0%)	3 (2.0%)
Gentamicina	117 (79.2%)	4 (2.7%)	28 (18.8%)	118 (78.5%)	4 (2.7%)	27 (18.1%)
Cefalotina	42 (28.2%)	40 (26.8%)	67 (45.0%)	50 (33.6%)	38 (25.5%)	61 (40.9%)
Ampicilina	41 (27.5%)	4 (2.7%)	104 (69.8%)	43 (28.9%)	4 (2.7%)	102 (68.5%)
Ertapenem	147(98.7%)	2 (1.3%)	0	149(100.0%)	0	0
Amoxicilina-Ac. Clavulánico	78 (52.3%)	39 (26.2%)	32 (21.5%)	75 (50.3%)	37 (24.8%)	37 (24.8%)
Ceftriaxona	112 (75.2%)	0	37 (24.8%)	111 (74.5%)	2 (1.3%)	36 (24.2%)

GRÁFICO 2. Comparación de las categorías de susceptibilidad determinadas por el método directo y estandarizado.



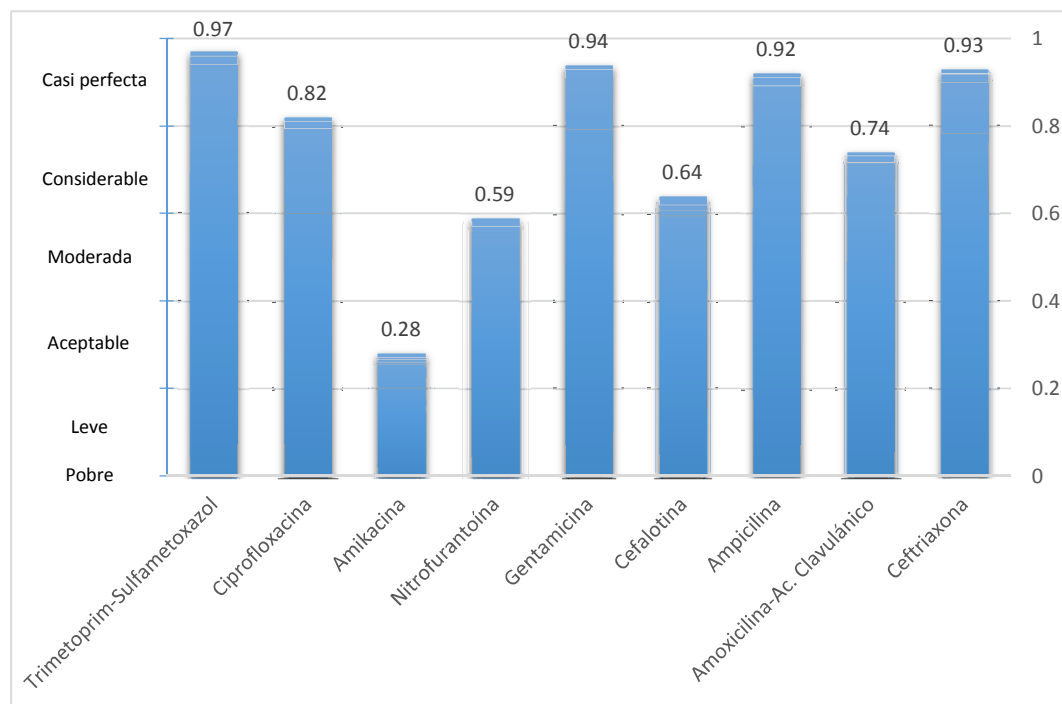
Para determinar el nivel de concordancia entre el método directo y el método estandarizado, se calculó el índice de correlación de Kappa. Para la variable identificación del patógeno, se halló un índice correlación de 0.89 que se categoriza según la escala de Landis y Koch como una concordancia “Casi perfecta”. En la variable antibiograma, se determinó el índice Kappa para los 10 antibiótico evaluado, hallándose para la Trimetoprim-Sulfametoxazol un índice Kappa de 0.97 (IC 95% 0.94 - 1.00), para Ciprofloxacina un índice de 0.82 (IC 95% 0.74 - 0.90), Gentamicina un índice de 0.94 (IC 95% 0.88 - 1.00), Ampicilina un índice de 0.92 (IC 95% 0.86 - 0.99) y Ceftriaxona un índice de 0.93 (IC 95% 0.86 - 1.00) cuyos resultados se valoran según la escala como una concordancia “Casi perfecta”. En el caso de la Cefalotina se halló un índice de 0.64 (IC 95% 0.54 - 0.74), en Amoxicilina – Ac. Clavulánico, un índice de 0.74 (IC 95% 0.64 - 0.83) que se valora como una concordancia “Considerable”. En la comparación del antibiótico Nitrofurantoína, se halló un índice de correlación de 0.56 (IC 95% 0.24 - 0.87) que se valora como una concordancia “Moderada” y para la Amikacina, se obtuvo un índice Kappa de

0.28 (IC 90% 0.01 - 0.55) que se categoriza como una concordancia “Aceptable”. En el caso del Ertapenem, no se calculó el índice de concordancia Kappa debido a que en el método estandarizado, todas las muestras resultaron ser sensibles al antibiótico y por el método directo solo dos muestras fueron reportados como intermedio y lo demás como sensibles; por lo tanto al presentarse el método estandarizado con una sola categoría de susceptibilidad se considera una constante donde no se puede calcular el índice Kappa (Tabla 7). Evaluándose en conjunto las concordancias obtenidas, más de la mitad de los antibióticos evaluados fue categorizado de “Considerable” a “Casi perfecta” concordancia entre ambos métodos (Gráfico 3).

TABLA 7. Concordancia entre el método estandarizado y el método directo según las variables estudiadas

Variable		Índice Kappa	IC 95%
Identificación		0.89	(0.78 - 0.96)
Antibiograma	Trimetoprim-Sulfametoxazol	0.97	(0.94 - 1.00)
	Ciprofloxacina	0.82	(0.74 - 0.90)
	Amikacina	0.28	(-0.04 - 0.55)
	Nitrofurantoína	0.59	(0.30 - 0.87)
	Gentamicina	0.94	(0.88 - 1.00)
	Cefalotina	0.64	(0.54 - 0.74)
	Ampicilina	0.92	(0.86 - 0.99)
	Ertapenem	-	-
	Amoxicilina-Ac. Clavulánico	0.74	(0.64 - 0.83)
	Ceftriaxona	0.93	(0.86 – 1.00)

GRÁFICO 3. Valoración del coeficiente Kappa calculado para cada antibiótico evaluado por el método directo.



Cuando se evaluó los reporte de susceptibilidad para cada antibiótico por ambos métodos, se encontró diferencias a los que se consideró como “errores” que según el grado de discrepancias, podían ser “errores muy mayores” cuando por el método directo se reporta como sensible y por el método estandarizado resultaban ser resistente, “errores mayores” cuando se reporta como resistente por el método directo y es sensible por el método estandarizado y “errores menores” cuando por el método directo se reporta como sensible y por el método estandarizado resulta ser intermedio y viceversa o cuando por el método directo se reporta como intermedio y por el método estandarizado reporta como resistente y viceversa.

Del total de comparaciones, se obtuvo 1 (0.07%) “error muy mayor”, 5 (0.34%) “errores mayores” y 92 (6.13%) discrepancias consideradas como “error menor” cuando se comparó los antibióticos (Tabla 8).

**TABLA 8. Frecuencia de los tipos de errores del total de comparaciones
(N=1490)**

Tipos de error	Frecuencia	%
Muy mayor	2	0.12
Mayor	5	0.34
Menor	90	6.13

V. DISCUSIÓN

La infección del tracto urinario se encuentra entre las infecciones más frecuentes atendidas en los centros de salud, afectando a ambos sexos variablemente según el grupo etario (1-4). Los estudios reportan que la mayor incidencia de la infección se produce en mujeres durante la edad fértil (3, 5, 6) comprendido entre 18 a 39 años (5). En el presente estudio, se observó que el grupo femenino de 21 a 40 años corresponde más del 50% de la muestra, lo que concuerda con el estudio publicado por Álvaro en Lima (2002) que presenta al grupo etario más afectado entre 20 a 44 años en un 52% (27), lo que pone en manifiesto que las relaciones sexuales y la gestación son factores importantes que favorecen la infección urinaria en mujeres (3, 5, 39). Cabe resaltar que la población atendida en el Hospital San Bartolomé es predominantemente mujeres, lo cual es un sesgo para más datos demográficos.

El urocultivo es prueba de laboratorio de mucha utilidad para el médico, pues le permite conocer la identidad del agente etiológico de la infección y brinda el listado de antibióticos para iniciar el tratamiento médico. Siguiendo el protocolo convencional del cultivo de orina, el reporte final es obtenido a las 48 horas luego de la recepción de la muestra en el laboratorio (10, 12,14); sin embargo, la identificación y antibiograma bacteriano por el método directo, es un protocolo alternativo que se ha sido evaluado para diferentes tipos de muestras clínicas (33-35,43), y que tiene como principal objetivo acortar el tiempo de demora del reporte de la identificación y el perfil de susceptibilidad del patógeno.

Más del 90% de las infecciones urinarias, son generalmente causadas por un solo microorganismo y con predominancia de las Enterobacterias (1, 3, 6 - 10, 44). En el presente estudio, por el método directo y estandarizado, el germen aislado en mayor frecuencia fue *Escherichia coli* (87%) seguido por *Klebsiella spp.* (12%) y *Proteus spp.* (1%), similar a lo obtenido en otros estudios nacionales realizados por La Madrid et al. (2004) y Luján et al. (2008) en Lima, que señalan a *Escherichia coli* como uropatógeno responsable del 70% a 88.4 % de las infecciones urinarias (8,9).

Comparando la identificación por el método directo y el estandarizado, se obtuvo un 97.4% de acuerdos en la identificación, con un índice Kappa de 0.89 (IC 95% 0.78 - 0.96) que se valora como una concordancia “Casi perfecta” según la escala de Landis y Koach (38), similar resultado publica Dupeyron et al. en Francia (1986) y Wang et al. en China (2013) quienes aplicaron el método directo siguiendo procedimientos modernos pero costosos como el Api 20 E y MALDI TOF, obteniendo un 100% (40) y 94,8% (41) de identificación correcta respectivamente, coincidiendo en la apreciación sobre la mejora del método cuando se trata de muestras monomicrobianas y con recuento mayor a 10^5 UFC/ml, como los que se incluyeron en el presente estudio.

En 2 de las muestras que se procesó, no hubo desarrollo en los medios diferenciales, pese a que el cultivo presentó un recuento mayor 10^5 UFC/ml, sin embargo no fue estadísticamente significativo ($p=0.48$). Este hallazgo se explicaría en la presencia de inhibidores residual en la muestra de orina, revisiones publicadas señalan que así como los antibióticos, ciertos componente de los alimentos excretados por la orina pueden generar un efecto bacteriostático (42), interfiriendo en la multiplicación eficiente en los medios diferenciales.

Respecto al antibiograma, se observa un similar perfil de susceptibilidad por el métodos directo y estandarizado, con un 98.1% de acuerdos en la categorización de susceptibilidad, lo que coincide con lo descrito por Guillenwater y Clarken EEUU (1996), Breteler et al. en Países Bajos (2011) y Bronnstan en Suecia (1999), quienes reportan un 98.2% (45), 96% (46) y 95.8% (47) de acuerdos por ambos métodos.

Para determinar el nivel de concordancia en el antibiograma, se calculó el índice Kappa y se categorizó según la escala de Landis y Koch para cada antibióticos, observándose que en los antibióticos Trimetoprim-Sulfametoxazol, Ciprofloxacina, Gentamicina, Ampicilina y Ceftriaxona se presentó una concordancia “Casi perfecta”, el caso de la Cefalotina y Amoxicilina – Ac. Clavulánico se obtuvo una concordancia categorizada como “Considerable” y por último con la Nitrofurantoina y Amikacina se halló una concordancia

“Moderada” y “Aceptable” respectivamente, que analizándose en conjunto nos permite asegurar que el método directo es válido y confiable.

Para el caso de Ertapenem, no se calculó el índice Kappa debido a que todos los aislamientos estandarizados resultaron ser sensibles y para la fórmula se consideró como una constante, lo cual concuerda con los reportes de hasta 100% de susceptibilidad a los Carbapenemes (8).

Es importante indicar que 5 antibiogramas directos fueron excluidos del análisis estadístico ($p=0,074$), debido al desarrollo de más de un germen en las placas, que generaron halos indefinidos e inadecuados para una medición, pese a que presentaron cultivo puro en el agar sangre y agar McConkey. Similar evento se observó en las muestras que presentaron cultivos mixtos en la siembra primaria en agar sangre, en cuyos casos se solicitó nueva muestra recalcando las condiciones adecuadas para la correcta recolección de la muestra de orina.

Con respecto a los tipos de errores en la categorización de la susceptibilidad, se clasificó la discrepancia como otros autores lo han presentado (33-35, 44-47); de las 1490 comparaciones generadas se encontraron 97 errores en total, 2 (0.12%) errores muy mayores, en donde se reportó sensible por el método directo y resistente por el estandarizado, 5 (0.34%) errores mayores cuando se reportó resistente por el método directo y sensible por el estandarizado, y 90 (6.13%) de errores menores cuando se reportó intermedio por un método y sensible o resistente por el otro. El número de errores se contrasta con los resultados de investigaciones como el de Sunqvist y et al. en Suecia (2014), donde analizaron 188 muestras, reportándose 3 errores muy mayores, 5 errores mayores y 7 errores menores (44), en el estudio realizado por Breteler y et al. (46) se procesaron 100 muestras de orina, se encontró 11 errores muy mayores, 2 errores mayores y 33 errores menores, y Bronestann et al. (47) quien analizó 882 muestras de orina obtuvo 15 errores muy mayores, 84 errores mayores y 182 errores menores.

En el presente estudio, se encontró un similar número de discrepancias en la categoría muy mayores y mayores con referencia a los estudios mencionados,

sin embargo se obtuvo mayor número de casos con discrepancia menor, este hallazgo se explica en el tipo de cepas aislado que al presentar el diámetro del halo de inhibición cerca al punto de corte, puede ser categorizado diferente solo con la variación de un milímetro, también estas discrepancias se pueden deber a la presencia de sub poblaciones resistente dentro de una misma cepa aparentemente homogénea, como lo describe Freeman et al. en Inglaterra (1996), mientras que para el método estandarizado se prepara el inóculo tomando una sola colonia, en el antibiograma directo se evalúa el perfil de susceptibilidad de la cepa total (48).

El antibiograma directo, presenta desventajas cuando se trata de muestras con recuento menores a 10^5 UFC/ml, debido a que el crecimiento no es confluyente en la placa, generando halos indefinidos e inadecuados para la lectura, y según los manuales bajo ciertas circunstancias recuentos menores a 100 000 UFC/ml admite la existencia de una infección del tracto urinario (10,12).

El método directo es un protocolo confiable cuando es aplicado con criterio, es imprescindible valorarlo de acuerdo al desarrollo en la placa de agar sangre, y para incrementar el costo beneficio de este método, se debería incorporar un método más de tamizaje, como el sedimento urinario, que aumenten la probabilidad de encontrar bacteriuria significativas, y que principalmente permita discriminar las muestras contaminadas.

En esta época en que vivimos, donde la resistencia bacteriana viene incrementándose constantemente, el tratamiento empírico basado en epidemiología va perdiendo valor. El método directo se presenta como un protocolo alternativo que permite reportar en 24 horas la identificación y antibiograma presuntivo que permita al clínico iniciar el tratamiento adecuado, sobre todo en pacientes críticos. Hay que remarcar, que los resultados del método directo deben ser siempre confirmados con el método estandarizado.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- ❖ La evaluación del método directo en la identificación de uropatógenos presentó un índice Kappa de 0.89, categorizado como una concordancia “Casi perfecta” en relación al método estandarizado.
- ❖ La evaluación del método directo frente al método estandarizado en el antibiograma, presentó un índice Kappa para la Trimetoprim-Sulfametoxazol de 0.97, Ciprofloxacina, 0.82, Gentamicina, 0.94, Ampicilina, 0.92 y Ceftriaxona, 0.93 categorizados como una concordancia “Casi perfecta”, en el caso de la Cefalotina presentó un índice de 0.64 y Amoxicilina – Ac. Clavulánico de 0.74 que se valoran como una concordancia “Considerable”, para la Nitrofurantoína se halló un índice de correlación de 0.56 considerada como una concordancia “Moderada” y para la Amikacina, se obtuvo un índice de 0.28 categorizada como “Aceptable”.
- ❖ El número de casos de errores, muy mayores, mayores y menores fue 93 de un total de 1490 comparaciones, explicándose las discrepancias por el aislamiento de cepas con halos de inhibición cerca al punto de corte y la presencia de sub poblaciones.
- ❖ El método directo es un protocolo confiable y válido, que permite optimizar el tiempo en el inicio del tratamiento, logrando evitar complicaciones y el uso irracional de antibióticos, considerando siempre que los resultados debe ser evaluado de acuerdo a la pureza del cultivo y posteriormente confirmados por el protocolo estandarizado.

6.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Para incrementar el costo beneficio del método directo, se debe de incorporar como método de tamizaje el sedimento urinario que además de aportarnos la presencia de leucocitos, nos permitiría discriminar las muestras contaminadas.

- ✓ Se debe realizar otros estudios que evalúen el método directo para los gérmenes Gram positivos, que también son responsables de las infecciones urinarias.
- ✓ Se debería realizar un estudio comparando la efectividad del método directo en la detección de las enzimas Betalactamasas de espectro extendido.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zarate Echevarría M, Sarmiento Aguilar E, Osoreo Plegue F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Med Per.* 2006; 23 (1): 26-31.
2. Luján-Roca D, Pajuelo-Camacho G. Método rápido para detección de bacteriuria en examen microscópico de orina no centrifugada. *Rev Biomed.* 2005; 16: 169-173
3. Alós J. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23 Supl. 4: 3-8.
4. Sociedad Chilena De Infectología. Comité de Microbiología Clínica. Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico de la infección urinaria. *Rev Chil Infect.* 2001; 18(1): 57-63.
5. González-Chamorro F, Palacios R, Alcover J, Campos J, Borrego F, Dámaso D. La infección urinaria y su prevención. *Actas Urol Esp.* 2012; 36(1): 20-26.
6. Cavagnaro Santa María F. Infección urinaria en la infancia. *Rev Chile Infect.* 2005; 22(2): 161-168.
7. Ochoa Sangrador C, Eiros Bouza J, Pérez Mendez C, Inglada Galiana L y Grupo de Estudio de los Tratamientos Antibióticos. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap.* 2005; 18(2): 124-135.
8. Astete La Madrid S, Flores Fukuda F, Buckley De Meritens A, Villarreal Menchola J. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Rev Soc Per Med Inter.* 2004; 17(1) 5-8.
9. Luján Roca D, Pajuelo Camacho G. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario. *Rev Fac Med UNAM.* 2008; 51(5): 201-204.
10. Andreu A, Cacho J, Coira A, Lepe J.A. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(1):52–57.

11. Málaga Guerrero S. Evidencias científicas en la infección urinaria. *An Pediatr (Barc)*. 2007; 67(5): 431-434.
12. De Cueto M. Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2005; 23 Supl. 4:9-14.
13. Aguilar Arenas G, Díaz Burke Y. El urianálisis como tamizaje previo a urocultivo. *Rev Mex Patol Clin*. 2005; 52(1):18-21
14. Garcia L, Henry D. Isenberg. *Aerobic Bacteriology 3: Urine Cultures*. En *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3ed. Washington. ASM Press; 2010.
15. Reyes Hurtado A, Gomez Ríos A, Rodriguez Ortiz J. Validez del parcial de orina y el Gram en el diagnóstico de infección del tracto urinario en el embarazo. Hospital Simón Bolívar, Bogotá, 2009 – 2010. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2013;64:53-59.
16. Cardona Villaroel N, Rojas Agreda C, Zabalaga Salcedo L. Leucocituria y tinción de Gram para el diagnóstico de infección urinaria. *Rev Soc Bol Ped* 2008; 47 (2): 81-85.
17. López Vargas J, Cuartas Trujillo M, Molina Upegui O, Restrepo Ceballos A, Maya Carmona C, Jaramillo Velasquez S, et al. Utilidad del citológico y la coloración de Gram en muestras de orina en el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados. *ATREIA* 2005; 18(4):311-384.
18. Ruiz Bedoya E, López Martínez B. Infección de vías urinarias. Detección por métodos rápidos de laboratorio. *Rev Mex Patol Clin*. 2008; 55(4): 201-206.
19. Campuzano Maya G, Arbeláez Gómez M. El Urianálisis: Un gran aliado del médico. *Rev Urol Colomb*. 2007; 3:67-92.
20. Florez Alfaro E, Parra Rojas I, Jimenez Acebedo A, Fernández Tilapa G. Pruebas presuntivas del análisis de orina en el diagnóstico de infección en vías urinarias entre diabéticos tipo 2. *Rev Salud Pública de Méx*. 2005; 47(5):376-380.
21. Gobernado M, López-Hontangas J. L. Identificación bacteriana. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2003; 21 Supl. 2:54-60.

22. Koneman Elmer W, Allen Stephen D, Janda William M, Schreckenberger Paul C, Winn Washington C. Capítulo 15: Pruebas de Sensibilidad Agentes Antimicrobianos. En Diagnóstico Microbiológico. 5ed. Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2003. Pp. 781-785.
23. Soto Pastrana J. Enteroscreen: Una Nueva Alternativa en la Identificación Bacteriana. Revista Peruana de Laboratorio Clínico. 2011; 1(1): 11-14.
24. Nodarse Hernández R. Lectura interpretada del antibiograma. Rev Cub Med Mil. 2013; 42(3):502-506.
25. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf.
26. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Capítulo 11: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. En Procedimientos en Microbiología Clínica. 1ed. España. 2000. Disponible en: www.seimc.org.
27. Avalos Ostos M. Perfil Microbiología y Resistencia Bacteriana de Infección del Tracto Urinario Adquiridas en la Comunidad en Pacientes Ambulatorios del Hospital Nacional Daniel A. Carrión. Callao – Perú. [Tesis para optar el título de Especialista en Medicina Interna] Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
28. Galas M., Ceriana P. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por el método disco difusión. En Manual de Procedimientos y control de calidad. 2001. Disponible en: www.cdc.gov.
29. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada. 10ed. Documento CLSI M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
30. Cona Trujillo E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev Chil Infect. 2002; 19 Supl. 2:77-81.
31. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad Antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima. Ministerio de Salud; 2002

32. Tucto Succhil S, Mercado Martinez P, Hurtado Escamilo T. Resistencia bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el de microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud. Rebiolest. 2014; 2(1): e26.
33. Oakes A, Badger R, Grove D. Comparison of Direct and Standardized Testing of Infected Urine for Antimicrobial Susceptibilities by Disk Diffusion. J Clin Microbiol. 1994; 32(1): 40-45.
34. Hollick G, Washington II J. Comparison of Direct and Standardized Disk Diffusion Susceptibility Testing of Urine Cultures. Antimicrob Agents Chemother. 1976; 9(5): 804-809.
35. Johnson J, Tiu F, Stamm W. Direct Antimicrobial Susceptibility Testing for Acute Urinary Tract Infections in Women. J. Clin Microbiol. 1995; 33(9): 2316-2323.
36. Sociedad Científica Peruana de Microbiología. Manual de procedimientos de Microbiología: Urocultivo. 1ed. Perú. 2012. Disponible en: www.socpemi.org.
37. Burriel Martí F, Lucena Conde F, Arribas Jimeno S, Hernández Méndez J. Capítulo 10 Química Analítica de los Aniones. En Química Analítica cualitativa. 18ed. España. Editorial S.A. Ediciones Paraninfo; 2001. Pp. 901.
38. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159-74.
39. Orregon Marin C, Henao Mejia C, Cardona Arias J. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Acta Med Colomb. 2014; 39 (4): 352-358.
40. Dupeyron C, Guillemin G, Leluan G. Rapid diagnosis of Gram negative urinary infections: identification and antimicrobial susceptibility testing in 24 hours. J Clin Pathol. 1986; 39:208-211
41. Wang X, Zhang G, Fan Y, Yang X, Sui X, Lu X. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time offlight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. J Micr Meth. 2013; 92: 231–235.

42. Risco E, Miguélez C, Sánchez de Badajoz E, Rouseaud A. Efecto del arandano americano (cysticlean®) sobre la adherencia de *Escherichia coli* a células epiteliales de vejiga. Estudio in vitro y ex vivo. Arch Esp Urol. 2010; 63 (6): 422-430.
43. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015.
44. Sundqvist M, Olafsson J, Matuschek E. EUCAST breakpoints can be used to interpret direct susceptibility testing of Enterobacteriaceae from urine samples. APMIS. 2015; 123: 152–155.
45. Gillenwater J, Clark M. tentative direct antimicrobial susceptibility testing in urine. J Urol. 1996; 156: 149-153.
46. Breteler K, Rentenaar R, Verkaart G, Sturm P. Performance and clinical significance of direct antimicrobial susceptibility testing on urine from hospitalized patients. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2011; 43: 771-776
47. Bronnestam R. Direct antimicrobial susceptibility testing in bacteriuria. APMIS. 1999; 107:437 - 444.
48. Freeman R, Sisson P, Burdess D. Heterogeneity within apparently pure cultures of *Escherichia coli* freshly isolated from significant bacteriuria. J Med. Microbial. 1996; 45:349-352.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Ficha de recolección de datos

EVALUACIÓN DEL MÉTODO DIRECTO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y
ANTIBIOGRAMA DE ENTEROBACTERIAS EN UROCULTIVO DE
PACIENTES CON BACTERIURIA SIGNIFICATIVA ATENDIDOS EN EL
HOSPITAL DOCENTE MADRE
NIÑO SAN BARTOLOMÉ 2013-2014

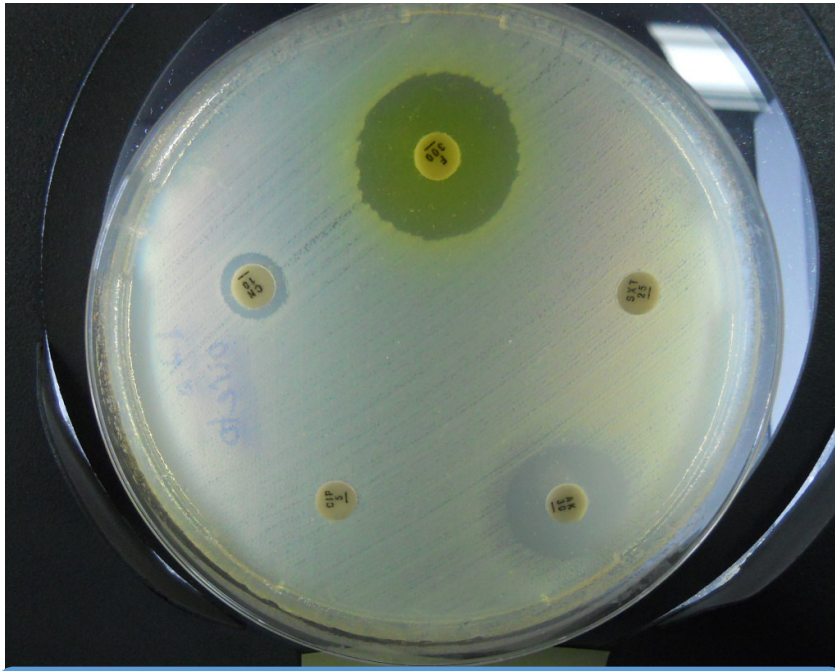
CÓDIGO INVESTIGACIÓN
FECHA

CÓDIGO LABORATORIO			
EDAD:	GÉNERO:	FEMENINO	MASCULINO

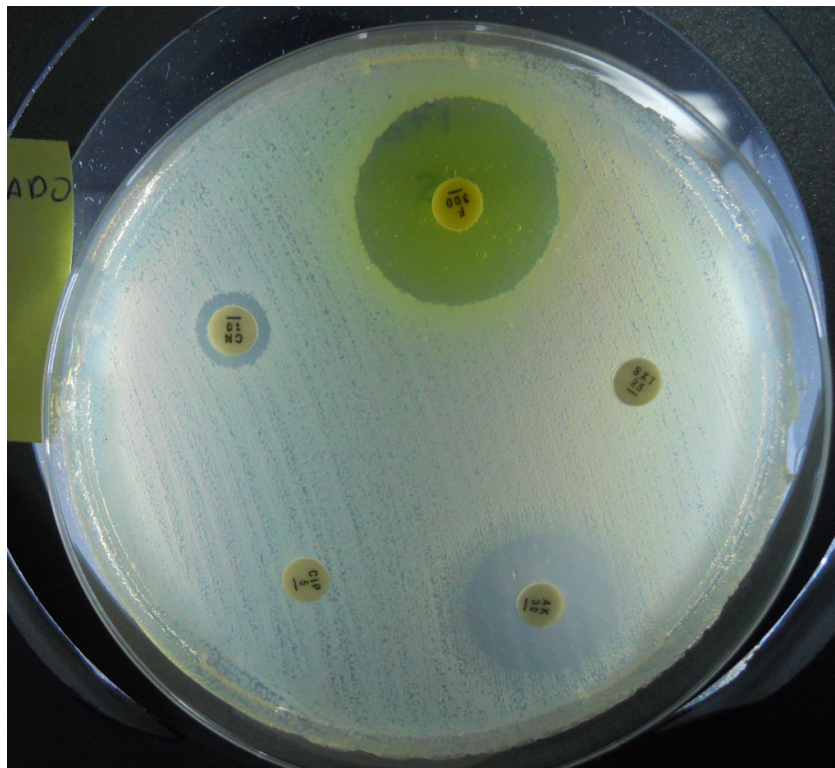
IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA DIRECTO		IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA ESTANDARIZADO	
CRITERIOS DE INCLUSIÓN		CRITERIOS DE INCLUSIÓN	
NITRITO:		AS:	
GRAM GÉRMEENES:		RECuento DE COLONIAS:	
		MC:	
<u>IDENTIFICACIÓN</u>		<u>IDENTIFICACIÓN</u>	
CITRATO:		CITRATO:	
TSI:		TSI:	
LIA:		LIA:	
UREA:		UREA:	
MIO:		MIO:	
GELATINA:		GELATINA:	
VP:		VP:	
ANTIBIOGRAMA		ANTIBIOGRAMA	
ANTIBIÓTICO	DIÁMETRO - CATEGORÍA	ANTIBIÓTICO	DIÁMETRO - CATEGORÍA
SXT		SXT	
CIP		CIP	
AK		AK	
NITRO		NITRO	
GEN		GEN	
KF		KF	
AMP		AMP	
ERT		ERT	
AMC		AMC	
CTR		CTR	

OBSERVACIONES:

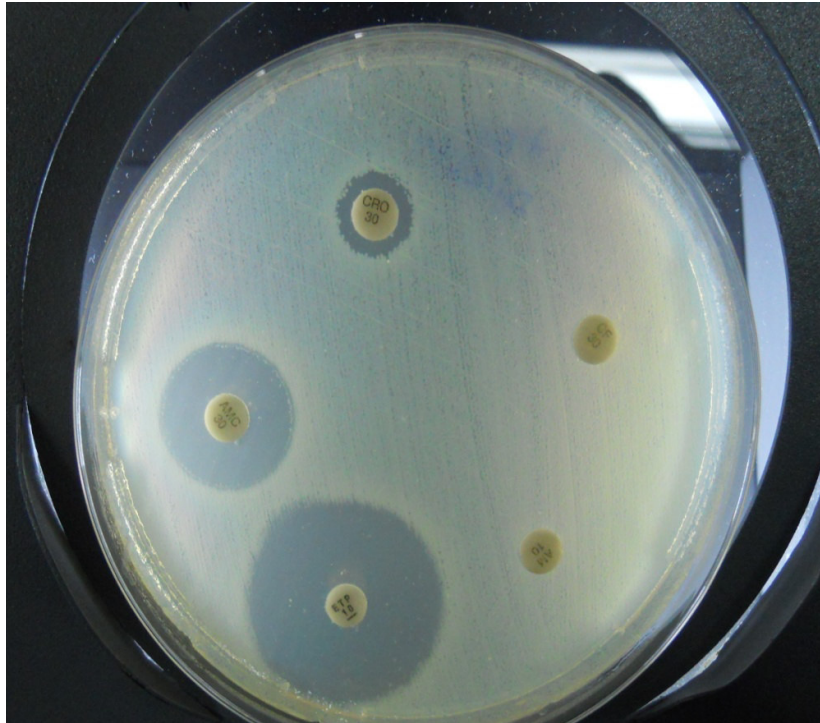
ANEXO 2. Placas de antibiograma del Método directo Vs Método estandarizado.



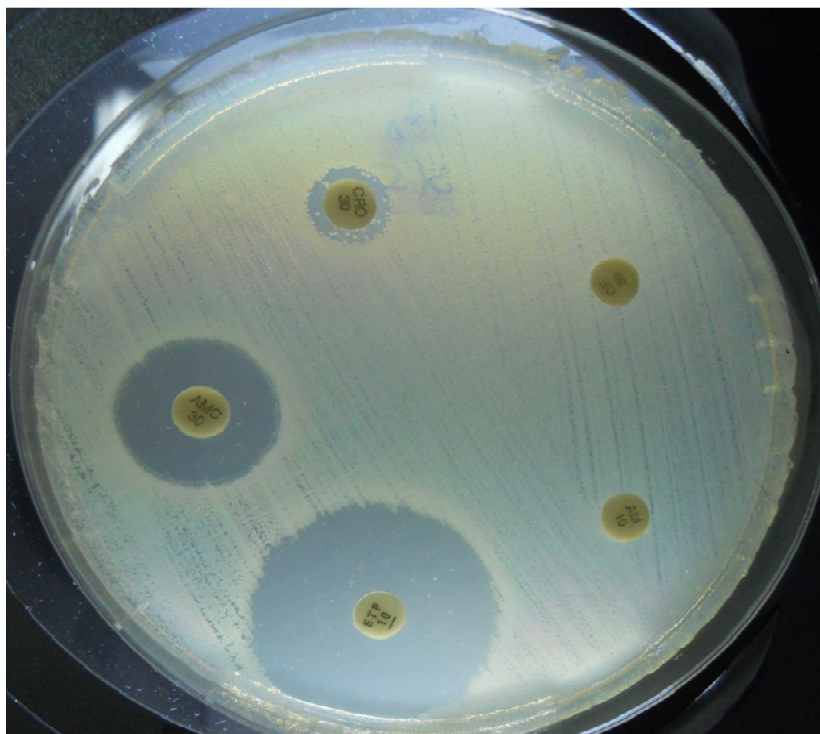
Antibiograma Directo



Antibiograma Estandarizado



Antibiograma Directo

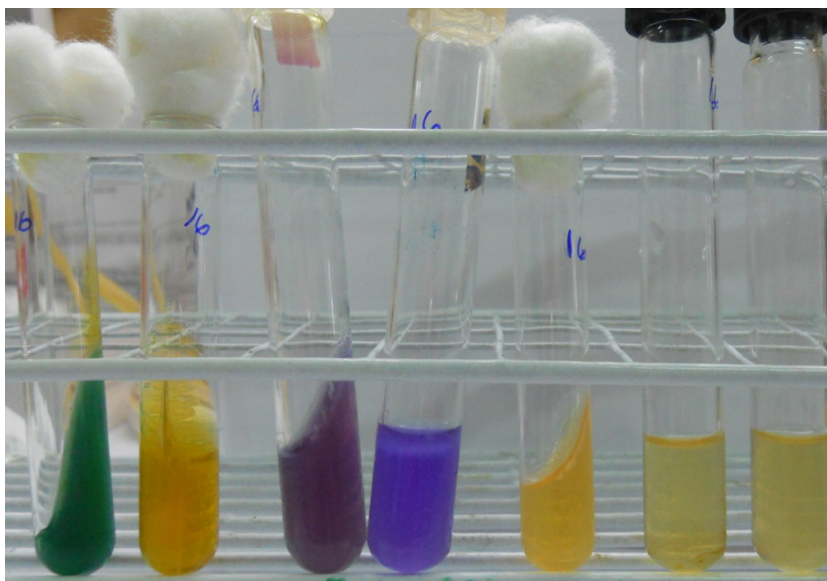


Antibiograma Estandarizado

ANEXO 3. Serie bioquímica de *Escherichia coli* por Método directo Vs el Método estandarizado

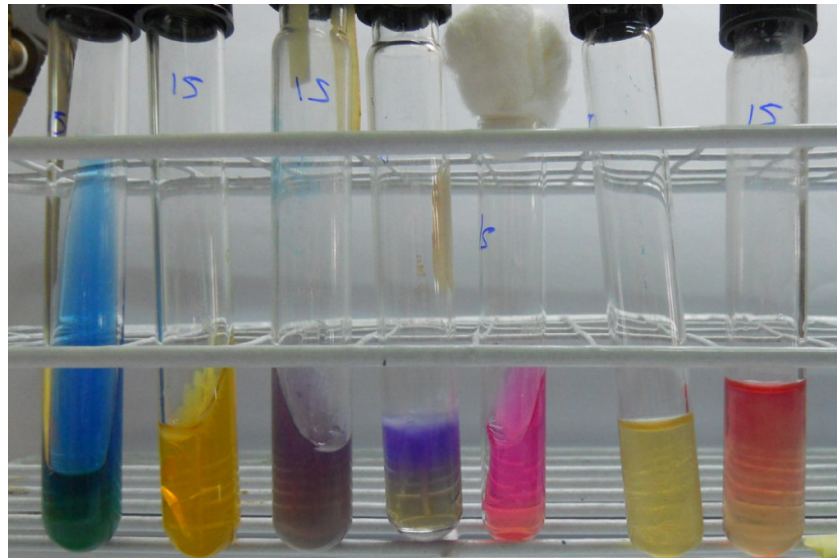


Serie Directa

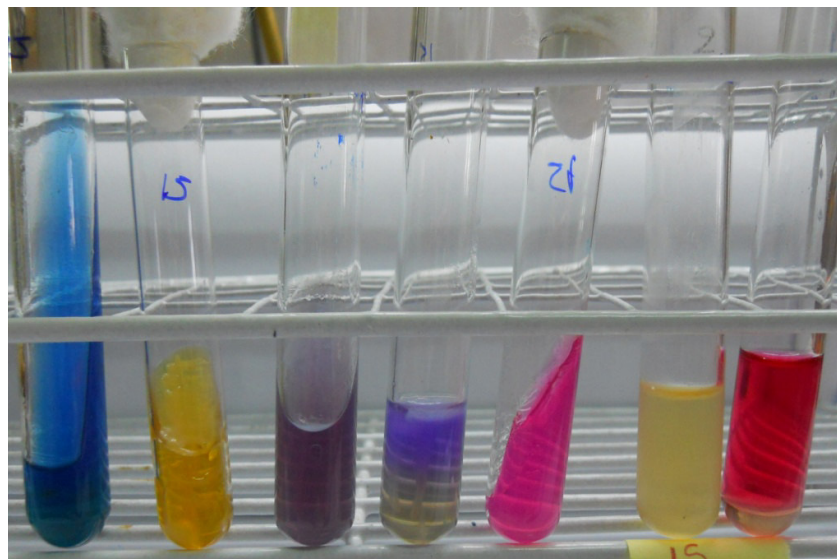


Serie Estandarizada

**ANEXO 4. Serie bioquímica de *Klebsiella pneumoniae* por Método directo
Vs el Método estandarizado**



Serie Directa



Serie Estandarizada